

EXPLORANDO CÉLULAS COMPETENTES PARA TESTAR CLONAGEM E PRODUÇÃO DE PLASMÍDEOS GRANDES (>12Kbs) – UMA ABORDAGEM PARA A TECNOLOGIA CRISPR/Cas9

Palavras-Chave: PLASMÍDEO, CÉLULA COMPETENTE, CRISPR/Cas9

Autores(as):

ANA CAROLINA DE SOUZA MACENA (PIBIC-EM), CEMIB – UNICAMP

LUIZA LORENÇATO (PIBIC-EM), CEMIB – UNICAMP

PÂMELA CAVALCANTE DOS SANTOS (PIBIC-EM), CEMIB – UNICAMP

NATHALIA ROCHA DE OLIVEIRA (coorientadora) – CEMIB, UNICAMP

MESTRE DANIELA CAGNOTO NORONHA (coorientadora) – CEMIB, UNICAMP

MESTRE MAYARA CRISTINA MOREIRA SILVA (coorientadora) – CEMIB, UNICAMP

MESTRE CATHERINE YESENIA CARRASCO MONTESDEOCA (coorientadora) – CEMIB, UNICAMP

Prof. Dr. MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT (orientador), CEMIB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As células competentes são fundamentais em manuseios da biotecnologia. Segundo Higa e Mendel (1970), elas se manifestam por meio da apresentação de um DNA externo. Consoante ao primeiro protocolo adotado por eles, o procedimento consiste em tratar as células com íons de cálcio, sucedido por uma exposição imediata a altas temperaturas, o que aumenta a flexibilidade celular, facilitando a indução do DNA exógeno - plasmídeo com genes de resistência a antibióticos. Posteriormente, Hanahan (1983) aprimorou a formulação dos meios de cultivo bacteriano, aperfeiçoando as condições das etapas do processo. No entanto, um dos fatores limitantes da execução se relaciona ao tamanho do plasmídeo, visto que a eficiência tende a ser menor paralelamente ao seu extenso comprimento.

No presente estudo, serão comparadas quatro linhagens de *E. coli* modificadas: DH10B, Stbl3, C2987 e DH5 α , para determinar qual delas apresenta maior capacidade de transformação e produtividade de plasmídeos contendo grande número de pares base de DNA. Isto é importante, uma vez que tecnologias como CRISPR/Cas9 funcionam a partir de plasmídeos com grande número de pares de base entre 12kb e 14kb. Nesse sentido, a transformação bacteriana é passível de ser monitorada em decorrência do cultivo em meio com antibiótico, que permitirá que somente as células que adquiriram o DNA circular do plasmídeo formem colônias em meios sólidos, com o objetivo de descobrir qual cepa é a mais apta para a captação do mesmo.

METODOLOGIA:

Iniciamos os estudos seguindo um protocolo para produzir e amplificar as bactérias e torná-las competentes, publicado inicialmente por Mandel e Higa, em 1970, para transformação artificial de *E. Coli*. Foram realizadas algumas variações e mudanças até o protocolo atual para testar diferentes condições.

- **Isolamento de uma colônia de bactéria:**

Inicialmente, foi preparado o meio de cultivo sólido (meio LB + 3% ágar), que passou por processo de esterilização por autoclavagem e mantido em temperatura ambiente. Para preparação das placas de cultivo de bactérias, o frasco contendo o meio sólido foi liquefeito sendo aquecido no micro-ondas. 10 mL do meio foi despejado em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que foram deixadas para solidificar meio. Foi realizada a técnica de estria simples para isolamento de colônias de cepas de *Escherichia coli* (*E. Coli*), que então foram incubadas em estufa a 37°C em um intervalo de 24 horas, a fim de conceder a formação das colônias bacterianas.

- **Preparação das Células Competentes**

As colônias individualizadas foram transferidas para o meio líquido (meio LB) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento das bactérias, 0,5 mL dessa pré-cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB mantido sob agitação a 37°C por 3 horas para atingir uma densidade adequada para a preparação.

Para início do protocolo para tornar as células competentes, essas foram resfriadas em gelo por 15 minutos, todas as etapas consecutivas foram conduzidas em gelo. As células foram centrifugadas a 7 minutos 3000 rpm. O pellet adquirido foi primeiramente lavado em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 100 mM gelado, e mais uma vez ressuspensionado em solução de CaCl₂ 100 mM gelado. A suspensão foi incubada em gelo por 45 minutos.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de CaCl₂ com 15% de glicerol, sendo transferido em alíquotas de 100 µL em 20 microtubos de 0,2 mL estéreis. Estas alíquotas foram mantidas em geladeira (4°C a 8°C) durante toda a noite e no dia posterior foram armazenadas em freezer a -80°C.

- **Transformação das bactérias**

Na segunda fase do experimento, foram retiradas do freezer três microtubos com alíquotas de cada uma das linhagens celulares utilizadas. As amostras foram prontamente movidas para o gelo, no qual mantiveram-se até que estivessem descongeladas, mas ainda preservadas em condições de baixa temperatura.

Em espaço estéril, usando o fluxo laminar, foi agregado 1 µL do plasmídeo pL-CRISPR-EFS-GFP (188 µg/mL) em 100 µL de células previamente descongeladas. A solução foi mantida no gelo por 30 minutos. Os microtubos com a solução foram expostos a um choque térmico, sendo mergulhados por 50 segundos em banho de 42°C. De imediato, as células foram novamente resfriadas no gelo por dois minutos.

Sequencialmente, cada amostra foi realocada para microtubos contendo 300 µL de meio líquido (LB) sem antibiótico, e incubada em estufa a 37°C durante uma hora para expressão do gene de resistência à ampicilina.

- **-Contagem do número de colônias transformadas**

Para a contagem de colônias de bactérias formadas foi utilizado também meio sólido LB, mas agora contendo 100 µg/mL de ampicilina (antibiótico). Foram plaqueados todos os 300 µL de células do item anterior sobre as placas de meio LB sólido + 3% de ágar + 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram transferidas para a estufa a 37°C e mantidas até o dia seguinte para o crescimento das colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo. No dia posterior, as mesmas foram transportadas para câmara fria e guardadas até a contagem do número de colônias crescidas por placa. Todo esse processo foi feito com as cepas DH10B, DH5α, C2987 e Stbl3, e repetido para a obtenção de dados a fim de comparar resultados.

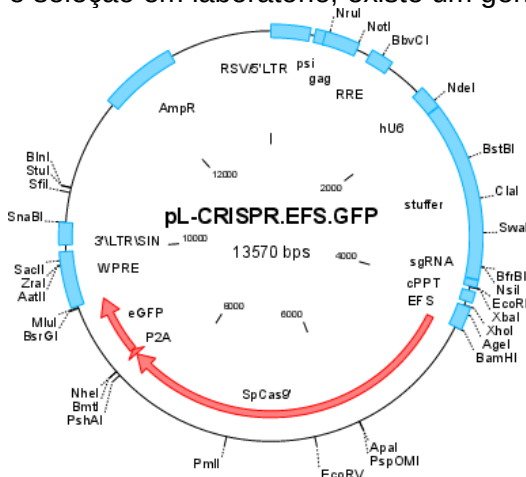
- **Análise estatística**

As amostras foram quantificadas e seus resultados foram utilizados para calcular a média e desvio padrão, assim como, realizar as análises de significância estatística, levando em consideração valores significativos considerando $p < 0,05$. Foi realizada a análise comparativa one way ANOVA, com teste de comparação múltipla de Turkey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

- **Plasmídeo Utilizado para o Teste de Competência Bacteriana**

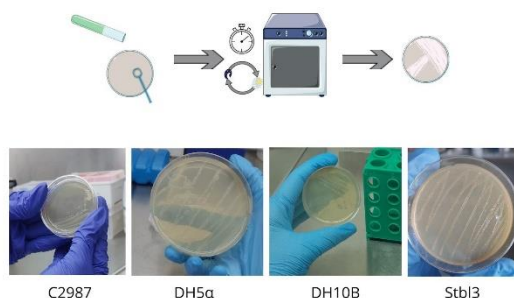
Utilizamos um plasmídeo considerado grande de extensão para verificar nossos objetivos. Para tal, o plasmídeo pL-CRISPR-EFS-GFP de 13,5kb, normalmente utilizado para a tecnologia do CRISPR/Cas9. Plasmídeos de grande extensão têm dificuldade de entrar em células competentes, diminuindo a eficiência de transformação destas células. Este plasmídeo foi utilizado para testar a eficiência de diferentes cepas de bactérias normalmente utilizadas em trabalhos de biologia molecular no laboratório. Este plasmídeo pode ser verificado na figura 1, contém em sua estrutura porções de expressão gênica relevantes aqui citadas para metodologia do CRISPR/Cas9, como gene para produção de guide, para a produção da proteína Cas9 e também para produção de uma proteína repórter GFP (proteína verde fluorescente). Além disso, para facilitar sua amplificação, transformação e seleção em laboratório, existe um gene de resistência a ampicilina.



[FIGURA 1] Representação gráfica de um plasmídeo.

- **Isolamento das Colônias de Bactérias**

Primeiramente, isolamos uma colônia de bactéria para evitar a propagação de possíveis mutações que, apesar de raras, podem vir a acontecer, além de homogeneizar o comportamento das células por ter a certeza de uma única origem, confirmando a cepa desejada. Na figura 2, demonstramos as etapas que foram realizadas para este fim. Quatro placas foram obtidas, sendo uma para cada cepa utilizada: DH10B, Stbl3, C2987 e DH5α.

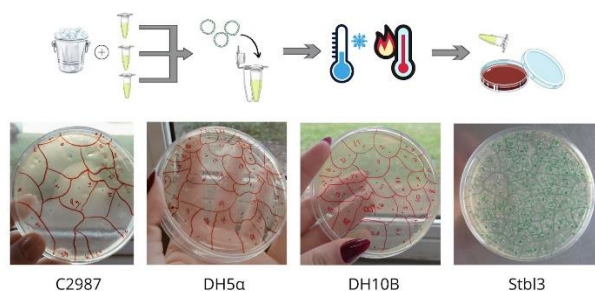


[FIGURA 2] Placas de Petri estriadas com as respectivas bactérias.

- **Células competentes e sua eficiência**

As células foram processadas por processo químico para obtenção de competência para adquirir o plasmídeo. Após a transformação das bactérias, realizada em presença de plasmídeo submetidas a um choque de temperatura, as células foram cultivadas em meio sólido com ampicilina (Figura 3). Para o processo químico, foi utilizado CaCl_2 para desestabilizar a parede e a membrana celular da bactéria. Com isso, a manutenção destas em baixa temperatura evitou sua degradação ou perda da competência. O fato de termos realizado um choque térmico, permitiu uma modificação morfológica da parede da bactéria facilitando a entrada do plasmídeo.

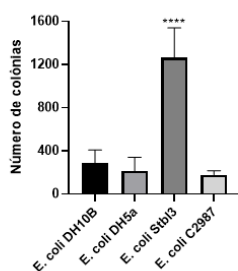
Posteriormente, as bactérias foram cultivadas em meio sólido contendo ampicilina, que foi um antibiótico que serviu como fator de seleção das bactérias que continham e que não continham o plasmídeo. Uma vez que as bactérias são sensíveis a este antibiótico, as únicas bactérias que cresciam no meio continham o plasmídeo, pois este tem um gene de resistência à ampicilina. Com isso, conseguimos quantificar a eficiência de transformação das bactérias pelo número de colônias formadas. Estas amostras comparativas podem ser observadas no gráfico da figura 4.



[FIGURA 3] Placas de Petri contendo bactérias previamente tornadas competentes e sua produção de plasmídeo.

Com os dados comparativos, nós obtivemos que a cepa Stbl3 teve um número significativamente maior que as outras, sendo esta a mais eficiente. Comparando as outras entre si não houve diferença significativa.

**** = $p < 0,0001$



[FIGURA 4] Tabela contendo os dados obtidos na contagem de colônias bacterianas cultivadas em meio contendo ampicilina.

CONCLUSÕES:

A pesquisa realizada sobre células competentes tem como finalidade otimizar processos laboratoriais, visando obter um resultado mais eficaz nas pesquisas que se utilizam células competentes para receber o DNA externo. Foi realizado o estudo com base nas quatro bactérias mais utilizadas no laboratório — C2987, DH5α, DH10B e Stbl3 —, sendo a Stbl3 considerada a mais eficiente. Calcular o quanto de plasmídeo cada bactéria produz também seria um ponto importante para ser analisado. Nos próximos passos, pretendemos avaliar a eficiência de produção de plasmídeos de cada cepa.

BIBLIOGRAFIA

Douglas Hanahan, Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, **Journal of Molecular Biology**, Volume 166, Issue 4, 1983, Pages 557-580, ISSN 0022-2836, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283683802848>)

Thermo Fisher Scientific; Estados Unidos. Disponível em: https://www-thermofisher-com.translate.goog/cl/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt&_x_tr_pto=tc; Acesso em: 05 de março de 2025.

Lorenz MG, Wackernagel W. Transferência de genes bacterianos por transformação genética natural no ambiente. *Microbiol Rev.* 1994 Set;58(3):563-602. doi: 10.1128/mr.58.3.563-602.1994. PMID: 7968924; PMCID: PMC372978.